

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-198719

(43) 公開日 平成7年(1995)8月1日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	D			
33/493	A			

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-298299

(22) 出願日 平成6年(1994)12月1日

(31) 優先権主張番号 08/160239

(32) 優先日 1993年12月2日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 391007079

マイルス・インコーポレーテッド
MILES INCORPORATED
アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、
エルクハート、マイルス・アベニュー
1884

(72) 発明者 キンーファイ・イップ

アメリカ合衆国、インディアナ州、46516、
エルクハート、イースト・ジャクソン・ブ
ールバード 2220

(74) 代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 尿タンパク質およびクレアチニンの測定法

(57) 【要約】

【構成】 水性溶液中のタンパク質およびクレアチニンの測定方法であって、

(a) 尿などの試料を用意し；そして以下の (b)

(c) の工程をどちらかの順で行う；

(b) 溶液のpHを、タンパク質濃度に関するイムノアッセイを実施するのに好適なレベルに調整し、次いでイムノアッセイ技術によってタンパク質濃度を測定する；および

(c) 溶液のpHを、クレアチニンに関するアッセイを実施するのに好適なレベルに調整し、次いでクレアチニンの比色測定のための試薬を添加することにより試料中のクレアチニン濃度を測定することを特徴とする方法。

【効果】 本発明によれば、尿タンパク質とクレアチニンを単一反応容器中で正確に測定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水性溶液中のタンパク質およびクレアチニンの測定方法であって、

(a) タンパク質およびクレアチニンを含有する溶液を用意し；そして以下の (b) (c) の工程をどちらかの順で行う；

(b) 溶液の pH を、タンパク質濃度に関するイムノアッセイを実施するのに好適なレベルに調整し、次いでイムノアッセイ技術によってタンパク質濃度を測定する；および

(c) 溶液の pH を、クレアチニンに関するアッセイを実施するのに好適なレベルに調整し、次いでクレアチニンの比色測定のための試薬を添加することにより試料中のクレアチニン濃度を測定することを特徴とする方法。

【請求項 2】 イムノアッセイの実施前に、pH を約 7 ～ 9 のレベルに調整する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 クレアチニンアッセイの実施前に、pH を約 11.5 ～ 12.5 のレベルに調整する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 クレアチニンの比色測定のための試薬が、ピクリン酸または 3,5-ジニトロ安息香酸である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 水性溶媒が尿である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】 イムノアッセイが凝集タイプのものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】 試験対象のタンパク質に対して特異的な抗体が、水に懸濁し得る粒子に結合している、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 タンパク質濃度を好適な pH で最初に測定し、次いで pH をクレアチニンの測定に好適なレベルに上昇させる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】 クレアチニンの測定を、pH を上昇させた時から約 30 分以内に開始する、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 クレアチニンの試験を、約 1 ～ 5 秒以内に開始する、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】 単一の反応容器における尿タンパク質およびクレアチニンの測定方法であって、

(a) 尿タンパク質およびクレアチニンを含有する尿試料を用意する；

(b) 尿試料の pH を、約 7 ～ 9 のレベルに調整し、イムノアッセイ技術によってタンパク質濃度を測定する；

(c) 尿試料の pH を、約 11.5 ～ 12.5 のレベルに上昇させる；

(d) クレアチニンの比色測定のための試薬を添加することにより尿試料中のクレアチニン濃度を測定することを特徴とする方法。

【請求項 12】 単一の反応容器における尿タンパク質およびクレアチニンの測定方法であって、

(a) 実質的に水平な回転軸と、尿タンパク質に対して

特異的な乾燥免疫試薬を包含する第一の反応ゾーン、および反応チャンネルに導入された反応液の pH をクレアチニン測定に好適なレベルに上昇させ得る乾燥塩基性試薬を包含する第二の反応ゾーン、を有する分析試薬反応チャンネルを有する反応容器を用意する；

(b) 尿タンパク質およびクレアチニンを含有する疑いのある尿試料と、免疫濁度測定手段により尿タンパク質濃度を測定するのに好適な pH に調整された反応液とを、反応容器に導入し、それを乾燥免疫試薬と接触させ、それにより免疫試薬を溶解させて免疫試薬と尿タンパク質との相互作用により反応液の濁度の増加を起こさせる；

(c) 時間の関数としての濁度の変化に基づいて尿タンパク質の濃度を測定する；

(d) 上記反応液とクレアチニン測定のための試薬とを、第二の反応ゾーン中の乾燥塩基性試薬と接触させ、それにより塩基性試薬を溶解させて上記反応液の pH をクレアチニンの比色測定に必要なレベルに上昇させる；そして

(e) 分光光度測定手段によりクレアチニンの濃度を測定することを特徴とする方法。

【請求項 13】 pH を、尿タンパク質の濃度の測定の前に約 7 ～ 9 のレベルに調整し、クレアチニンの測定の前に約 11.5 ～ 12.5 のレベルに上昇させる、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】 クレアチニンの測定を、pH を約 11.5 ～ 12.5 のレベルに上昇させた時から約 30 分以内に開始する、請求項 12 記載の方法。

【請求項 15】 クレアチニンの測定を、1 ～ 5 秒以内に開始する、請求項 14 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、水性溶液中のタンパク質およびクレアチニンの濃度を測定する方法および反応容器（試験具）に関する。より詳しくは、尿試料中のタンパク質（例えばアルブミン）およびクレアチニンの濃度を測定する方法および反応容器に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ヒト血清アルブミン（HSA）は、尿中の測定可能なタンパク質の一つであり、腎症（ネフロパシー）、すなわち、腎臓の異常な状態の初期段階を検出することにおいて臨床的に重要である。インシュリン依存性糖尿病（IDDM）およびインシュリン非依存性糖尿病（NIDDM）を患っている患者の高パーセンテージの者が、正常集団の上限を越えるレベルで HSA を最終的に排泄する。

「ミクロアルブミン尿症（microalbuminuria）」のこの段階は、だんだん悪化してネフロパシーに至る。ミクロアルブミン尿症の段階での腎臓の損傷は適切な療法を施すことにより制御または逆転させることが可能であるので、ミクロアルブミン尿症の測定は IDDM および NI

DDMの総合的な手当の一部であることがよく認識されている。

【0003】他の尿媒介性タンパク質、例えば、IgG、 α -1-ミクログロブリン、ベンス・ジョーンズタンパク質およびN-アセチル-D-グルコサミニダーゼは、タンパク尿症の腎前方、糸球体、および腎後形態を検出し、区別するためのマーカーとして有用である。タンパク尿症は、尿中のタンパク質濃度が30mg/dLを越える場合に示され、種々の異なる腎臓病に関して共通する症状である。したがって、腎臓病学者、糖尿病学者および心臓病学者の側には、尿中のこれらのタンパク質の測定のための高感度で、特異的で、定量的な試験方法の必要性が存在する。

【0004】尿タンパク質のアッセイの感度および特異性を増し、尿の希釈をもたらす高い尿流速の問題を最小にするためには、タンパク質/クレアチニン比を尿タンパク質アッセイ結果に用いて尿濃度を正規化（標準化）する。典型的な尿タンパク質分析は、イムノアッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、ラテックス使用イムノアッセイおよび免疫濁度測定アッセイ（immunoturbidimetric assay）を包含する。アルカリJaffe法およびBenedict-Behre法のような一般的なクレアチニンアッセイは、典型的には11.5~12.5の範囲の高pHで実施される。現代の臨床実験室における一般的な実務は、タンパク質アッセイとクレアチニンアッセイを別々に実施し、次いでこれらのアッセイから得られた値を一緒にしてタンパク質-クレアチニン比を生成するものである。尿流速が高い患者は尿の希釈のために人為的に低いタンパク質値を有し得るので、また、クレアチニンは尿の希釈の良いマーカーであるので、タンパク質/クレアチニン比を使用することは、尿希釈の問題を排除し、真のタンパク質排泄率のより正確な反映を与える。

【0005】Clin. Chem. 32/8, 1544-1548 (1986)において、Wattsらは低濃度の尿アルブミンの測定のための4つの免疫化学的方法（ラジオイムノアッセイ、放射免疫拡散法、免疫濁度測定アッセイおよび酵素結合免疫吸着アッセイ）を考察している。彼らは、糖尿病性ネフロパシーはインシュリン依存性糖尿病による死亡の主要な原因であること、および臨床化学実験室は、実行可能で、アルブミンについて特異的で感度が良い技術が必要としていることを指摘している。Wattsらは、さらにPractical Diabetes vol. 9, No. 3, pp. 84-86において、ミクロアルブミン尿症は指示薬色素結合試験による検出を免れる尿アルブミンの正常を上回る（supranormal）量であること、そしてそれは糖尿病患者における初期のネフロパシーと心臓血管疾患の両方の強力なマーカーであることを指摘している。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は尿試料の同一の

アリコートを用いて単一の反応容器中で尿タンパク質およびクレアチニンを測定する方法である。本発明の方法は以下の工程を包含する：

（a）タンパク質およびクレアチニンを含有する疑いがある尿試料を用意し、そして以下の（b）（c）の工程をどちらかの順で行う；

（b）尿試料のpHを、タンパク質濃度に関するイムノアッセイを実施するのに好適なレベルに調整し、次いでイムノアッセイ技術によってタンパク質濃度を測定する；および

（c）尿試料のpHを、クレアチニンに関するアッセイを実施するのに好適なレベルに調整し、次いで尿試料中のクレアチニン濃度を測定する。

個々のタンパク質濃度およびクレアチニン濃度を測定した後、それらの比を算出する。

【0007】本発明の実施においては、クレアチニンをタンパク質より先に測定するオプションAと、タンパク質濃度を初めに測定してから試験中の尿試料のクレアチニン濃度を測定するオプションBの、いずれを用いることも可能である。測定を実施する順番にかかわらず、尿試料のpHを、このアッセイに関して最適なpH範囲である約7~9のpHで実施されるタンパク質のイムノアッセイの要件に適合するように調整することが必要である。クレアチニンアッセイは、アッセイ系が正しく作動し得るようにクレアチニンを脱プロトン化するために、約11.5~12.5のpHで実施する。尿中のクレアチニンの測定に関する最初の実用的な試験は、Jaffe法として知られ、アルカリ溶液中でのピクリン酸とクレアチニンの結合による赤黄色を帯びた褐色のピクリン酸クレアチニンの形成を包含する。より最近のクレアチニン測定法は、Benedict-Behre法として知られ、別のクレアチニン反応性試薬である3, 5-ジニトロ安息香酸とクレアチニンのアルカリ媒体における反応を包含する。クレアチニンを脱プロトン化するために必要な高pHでクレアチニンと接触すると有色応答を提供するいかなる試薬も、この工程での使用に好適である。

【0008】本発明の分析方法は、タンパク質とクレアチニンの測定をどちらの順でも実行することができる。オプションAによれば、尿試料を強アルカリおよびクレアチニン測定に好適な試薬と混合し、典型的には分光光度測定手段により得られるクレアチニン濃度測定のための色を生じさせる。次いで反応混合物のpHを、適切な酸性化剤（acidifier）を用いて低下させ、抗体試薬と混合してタンパク質濃度測定のための濁度を生じさせる。

【0009】オプションBにおいては、尿試料を抗体試薬と混合してタンパク質濃度測定のための濁度を生じさせる。次いでアルカリ試薬および適切なクレアチニン指示薬を添加して、pHを上昇させ、クレアチニン濃度測定のための色を生じさせる。

【0010】尿試料および試薬溶液の容量は、特定の分

析環境に好都合などな量にもすることができるが、一方、少なめの量、例えば、1～50 μ l の尿、および20～1,000 μ l のクレアチニン試薬およびタンパク質のための免疫試薬を含有する緩衝液で充分である。

【0011】オプションAを用いて測定を実行する場合、有色のクレアチニン反応産物は次の工程におけるタンパク質の濁度測定アッセイに干渉するので、クレアチニンおよびタンパク質アッセイの間に遅延が生じる。したがって、オプションBが好ましい方法である。これは、抗体/タンパク質反応の凝集生成物はアルカリおよびクレアチニン試薬を添加するとほとんど直ちに溶解し、アッセイのこの部分はタンパク質測定の約1秒以内に実行することができるということが発見されたためである。

【0012】この点において、免疫凝集を包含する比濁アッセイまたは濁度測定アッセイにおけるような光散乱を包含するタンパク質アッセイ技術は、本発明における使用に特に好適である。これは、タンパク質と抗体との間での凝集アッセイ、またはラテックスに結合した抗体凝集タイプの凝集アッセイであることができる。この場合、タンパク質の特定のエピトープに特異的な抗体もしくはそのフラグメントが、水に懸濁し得る粒子（例えば、ポリスチレンまたは他のラテックス）およびタンパク質に結合する。抗体または抗体-ラテックスの多数のエピトープ結合部位と、タンパク質上の複数のエピトープとを一緒にすることにより、抗体または抗体-ラテックスとタンパク質との間で大きい凝集塊を形成させることができる。この凝集塊は、分光光度測定により測定可能な濁度を生み出し、その濁度の度合いを試験試料中のタンパク質濃度と相関させる。以下の実施例により、本発明の方法を用いるHSAおよびクレアチニンの分析を説明する。

【0013】

【実施例】

実施例1

オプションAによるHSAおよびクレアチニンの測定

5%ポリエチレングリコール溶液1.08mlに、HSA、クレアチニンまたはHSAとクレアチニンの混合物からなる試料60 μ l を添加した。これに続いて、アルカリ試薬30 μ l（リン酸カリウム、pH13.5）およびDNBA30 μ l によりクレアチニンアッセイを開始し、そこで531nmでの吸光度を200秒間測定した。吸光度の増加率は、試料中のクレアチニンの濃度に比例する（図1に示す）。図1から、試料中のクレアチニンの濃度は20～500mg/dLの範囲で正確に測定可能であることが決定される。測定の直後に、トリスHCl

〔トリス緩衝剤はトリス（ヒドロキシメチルアミノメタン）である〕50 μ l を添加した。この緩衝液により有色のクレアチニン反応産物が破壊された後（2～3分）に、抗血清（HSAに対するヤギ抗体）60 μ l を添加

した。再び531nmでの吸光度を150秒間測定した。吸光度の増加率は、図2に示すように試料中のHSAの濃度に比例する。図2から、HSAの濃度は5～500mg/Lの範囲で正確に測定可能であることがわかる。

【0014】オプションBによるHSAおよびクレアチニンの測定

4%ポリエチレングリコール、10mMトリス、10mMEDTAおよび0.02%アジ化ナトリウムからなるアッセイ緩衝液（pH8.5）の1.08mlに、試料（HSA、クレアチニンまたはHSAとクレアチニンの混合物）60 μ l を添加した。これに続いて抗血清試薬60 μ l によりHSAアッセイを開始した。531nmでの吸光度を200秒間測定した。吸光度の増加率は、試料中のHSAの濃度に比例する。濁度測定によるHSA測定の後、アルカリ試薬30 μ l を添加し、続いて3,5-ジニトロ安息香酸（DNBA）試薬30 μ l を添加した。アルカリ添加後直ちに濁度は清澄になり、クレアチニンアッセイの開始に当って全く遅延が起こらなかった。再び531nmでの吸光度を3分間測定した。吸光度の増加率は、試料中のクレアチニンの濃度に比例する。HSAアッセイおよびクレアチニンアッセイを一緒にして図3に示す。図3から、試料中のHSAの濃度は5～1,000mg/Lの範囲で正確に測定可能であり、続いて試料中のクレアチニン（150mg/dL）を正確に測定することができることがわかる。

【0015】尿中のタンパク質とクレアチニンの組合せ分析が上述した湿式分析フォーマットによってうまく作動する一方で、それが米国特許第4,990,075号に開示されているような連続的分析アッセイを実施するための反応容器への適用に特に好適であることを、我々は見出した。上記の特許は、液体試験試料中の分析対象物と相互作用してその分析対象物の関数として検出可能な応答を生じる第一および第二の分析試薬を包含させた第一および第二の反応ゾーンを含む分析試薬反応チャンネルと、実質的に水平な回転軸とを有する反応容器を開示する。第二の反応ゾーンは第一の反応ゾーンから予め決められた距離だけ離して設けられ、第一の反応ゾーンと液体が流通する状態（フルイドコミュニケーション）にある。それにより、反応チャンネルに入れられた液体試験試料は、回転軸に関して反応容器を回転させることにより反応ゾーン間を反応チャンネルに沿って重力により輸送されることが可能である。反応容器は、液体試験試料の単一方向の流れを反応容器中に提供するための液体試験試料送達手段と、液体試験試料を送達手段に導入するための、送達手段と液体が流通する状態にある導入口手段とを有する。

【0016】タンパク質/クレアチニンアッセイは、以下に記載するAまたはBのいずれかの形状を用いるこの反応容器において実施することができる。図4では形状Aが用いられており、モノサッカリド、ジサッカリドま

たはオリゴサッカリドのような添加剤と抗体との混合物が、反応容器10の第一の反応チャンバー24中の第一の試薬部位28上に乾燥されている。添加剤は、乾燥中、および乾燥後の長期貯蔵中に抗体を安定化する傾向があるので、望ましい。添加剤は、乾燥した試薬の剥離およびひび割れを防止するための物理的安定性をも提供する。

【0017】この試験具は、例えば分析すべき少量の尿のような液体試験試料の試験具への導入を可能にする送達チャンバー23を形成する内壁14を有する。そして、送達チャンバーは反応チャンネル21と液体流通状態にあるので、液体試験試料は送達チャンバーを通して反応チャンネルに入ることができ、その回転の水平軸に沿って試験具を時計回りに回転させることにより反応チャンネルに沿って流される。試験試料は、図4に示すようなキャピラリディスペンサー12を通して好都合に送達される。

【0018】少量の尿のみが送達チャンネルを通して導入されることになるので、好適な緩衝剤を含むさらなる反応液を、送達チャンネルを通して、または本発明の分析アッセイ手順を実施するための緩衝液および／または液体試薬を含有するよう適合させた液体送達リザーバー26のような別の供給源から導入することができる。液体送達リザーバーは、必要時まで液体を保持する液体リザーバーとして働く凹部26をその中に有するリザーバー27を包含し、それは反応チャンネル21へリザーバー26中の液体が流れ得るように除去することができる膜（示されていない）でおおわれている。簡便な試験具の操作で、液体リザーバー26からの液体に担持された液体試験試料を、視認チャンバーを通して視認するための位置に流入させることになる。

【0019】反応容器は、第一の反応ゾーン24を有し、これは典型的には反応チャンネル21中に入っている。第一の反応ゾーンは、図8において18aおよびbとして示されている側壁の一方または反応容器16の内壁に典型的に付着している第一の試薬部位28に乾燥抗体試薬を含有する。試験具の好適な回転は、部位28の乾燥抗体試薬を反応液と接触させ、その溶解を容易にする。抗体試薬が尿試験試料を担持する反応液中に適当に溶解したら、試験具10を右に45°回転させて視認口42をこの液体でカバーさせ、ここで分光光度計で読み取りを行い、時間の関数としての濁度の変化を測定する。これらの読み取りを既知の量のタンパク質を含有する尿試料を用いて作製したグラフと比較することにより、試験試料中のタンパク質濃度を決定する。

【0020】この時、アッセイ系は、分析手順の第二の工程の準備ができており、それはクレアチニン濃度の測定である。DNBAのような好適なクレアチニン試薬および同様の添加剤の混合物、および糖添加剤と同じ機能に役立てるための非反応性タンパク質、ポリエチレン

リコール、ポリエステルもしくはポリビニルアルコールのような水溶性ポリマーを、第二の反応ゾーンに位置する第二の試薬部位32aの上に乾燥させる。アルカリ試薬と添加剤の混合物を水溶性ポリマーと共に、物理的に互いに離れるように試薬部位32aから反対の容器壁に存在する第三の試薬部位32bの上に乾燥させる。液体緩衝試薬は、典型的には凝集を増強するためのポリエチレングリコール、トリス、保存剤としてEDTAおよびアジ化ナトリウム、抗体の安定剤として、および望ましくない反応生成物の形成を防止するための塩化カリウム、およびpH7~9で反応容器へのタンパク質の非特異的吸着を防止するためのゼラチン、加水分解ゼラチン、オブアルブミンおよびカゼインのような非反応性タンパク質を含んでおり、これを、アッセイするべきタンパク質およびクレアチニンを含有する尿試料とともに容器中に導入する。

【0021】タンパク質アッセイが完了した後、容器をさらに135°右に回転させてもとの位置から逆転させ、緩衝剤溶液を、試薬部位32aで乾燥クレアチニン検出試薬と、そして部位32bでアルカリ試薬と接触させ、それにより図7に示されるようにその溶解を起こさせる。これは、クレアチニン測定反応が起こるのに必要な11.5~12.5のレベルまで緩衝剤溶液のpHを増加させる結果となる。

【0022】予期せぬことに、クレアチニン濃度は、この溶解工程の少し後、すなわち、1秒以内またはより典型的には試料を混合し測定を開始するのに必要な時間

（約5秒間）のうちに、分光光度計により測定することができる。これは、タンパク質／抗体凝集によって起こった緩衝剤溶液の曇りが、この溶液をクレアチニン測定試薬および強アルカリと接触させると迅速に清澄になるという発見による。曇った緩衝剤溶液が、比色測定クレアチニン分析が成功して実行されるほど十分に清澄になるには通常何日もかかるので、このことは、アッセイ系をかなりスピードアップする。典型的には、タンパク質アッセイを完了後クレアチニンアッセイを開始する前に、忙しい臨床検査実験室のオペレーターは、約30分以上、好ましくは5分以上または1分でさえず待とうとしない。望ましい場合には、タンパク質の分光光度計による測定値をとった直後にクレアチニンアッセイを実施することができる。

【0023】クレアチニン検出試薬およびアルカリ試薬の溶解後、試験具を図6に示されている位置に回転させて戻す。ここで分光光度計の読み取りを、時間の関数としての色形成を得るための時間にわたって視認口42を通してとり、これを、既知のクレアチニン濃度を有する試料で作成したクレアチニン測定と比較して未知のクレアチニン濃度を確認する。

【0024】形状Bの場合には、抗体と添加剤の混合物を第一の試薬部位28上に乾燥させ、アルカリ試薬およ

び添加剤の混合物を第二の試薬部位 32a または b のどちらかの上に乾燥させる。クレアチニン試薬、ポリエチレングリコール、トリス、EDTA、アジ化ナトリウム、塩化カリウムおよび非反応性タンパク質を含む pH 7~9 の液体緩衝剤を、タンパク質およびクレアチニンを含有する尿試料とともに容器中に導入する。緩衝剤溶液は、前のように抗体試薬を可溶化し、タンパク質濃度は視認口 42 を通して分光光度計により測定する。タンパク質濃度の測定後、緩衝剤溶液を第二の試薬部位の乾燥アルカリ試薬と接触させ、それによりアルカリを溶解させて pH をクレアチニンアッセイの実施に必要なレベルに上昇させる。どちらの形状でも、等価の結果を達成するために前に記載した反応容器とともに用いることができる。

【0025】ある具体的な態様においては、HSA に対するヤギ抗血清を、第一の試薬部位上で乾燥させることにより抗体試薬として用いた。この物質は、商業的に入手可能であり、さらに処理することなしに用いることができる。好ましくは、抗血清は 2 倍に濃縮し、安定剤として 2~5 % のレベルのスクロース/トレハロース混合物と合わせる。試薬の 15 μ l 試料を、60℃ および乾燥時間 15 分で作動させた乾燥トンネルを用いて反応部位上で乾燥させる。

【0026】クレアチニンのためのアルカリ試薬は、アルカリ水酸化物溶液（例えば、2.5M KOH）、または適正な pH を維持するためのホスフェート、ボレートもしくはグアニジン誘導体のようなアルカリ緩衝物質とアルカリ水酸化物との混合物を含む。典型的には、スクロース/トレハロース混合物と合わせた 1M ホスフェートおよび 4M 水酸化カリウムの混合物 15 μ l を、60℃ および乾燥時間 15 分で作動させた乾燥トンネルを用いて第二の試薬部位上で乾燥させる。

【0027】好ましいクレアチニン試薬である DNBA は、典型的には、10 % の糖またはポリマー添加剤を含有するその 1.4M 水性溶液から、この溶液の 15 μ l 試料を適用して前のように乾燥させることによって第二の試薬部位に適用する。

【0028】実際の操作においては、形状 A を用いて、緩衝剤溶液（4 % ポリエチレングリコール、2.5mM トリス、5mM EDTA、0.1 % アジ化ナトリウム、および非反応性タンパク質として 0.1 % ゼラチン；pH 8.5）0.57ml 試料、および試料（尿中の HSA およびクレアチニン）30 μ l をカートリッジに導入して反応を開始させた。試料ブランクの測定後、抗体試薬を溶解させて 531nm での吸光度を 120 秒間測定した。吸光度の増加率を、HSA 濃度を測定するために用いた。アルカリ試薬および DNBA 試薬を次いで溶解させ、クレアチニン濃度を吸光度の増加率により測定した。溶液はクレアチニン試薬の溶解後迅速に清澄になったので、こ

の工程を、1 秒の短い時間、通常は 1~5 秒間のうちに実施することが可能であった。

【0029】形状 B を用いる分析を、緩衝液中の DNBA 溶液 0.57ml（4 % ポリエチレングリコール、2.5mM トリス、5mM EDTA、0.1 % アジ化ナトリウム、100mM KCl および 10mg/ml DNBA；pH 8.5）、および尿中 HSA およびクレアチニン 30 μ l をカートリッジに導入して反応を開始し、実施した。試料ブランクの測定後、抗体試薬を溶解させ、531nm での吸光度を 1 または 2 分間測定した。HSA 濃度は吸光度の増加率の関数として測定した。アルカリ試薬を次いで溶解させ、再び 531nm での吸光度を 3 分間測定して、クレアチニン濃度を吸光度の増加率から測定した。

【0030】図 9 は、この手順で測定した、異なる濃度の HSA および 148mg/dL のクレアチニンを含有する試料の反応応答プロフィールを表わす。図 9 から、尿試料中の HSA 濃度は、5~500mg/L の範囲で正確に測定可能であり、続いて試料中のクレアチニン（148mg/L）を正確に測定可能であることがわかった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】オプション A によるクレアチニンの測定を示す図。

【図 2】オプション A による HSA の測定を示す図。

【図 3】オプション B によるクレアチニンおよび HSA の測定を示す図。

【図 4】本発明の方法を実施し得る反応容器（形状 A）。

【図 5】本発明の方法を実施し得る反応容器。

【図 6】本発明の方法を実施し得る反応容器。

【図 7】本発明の方法を実施し得る反応容器。

【図 8】本発明の方法を実施し得る反応容器。

【図 9】反応容器によるクレアチニンおよび HSA の測定を示す図。

【符号の説明】

10：反応容器（試験具）

12：キャピラリディスペンサー

14：内壁

16：内壁

18：側壁

21：反応チャンネル

23：送達チャンバー

24：第一の反応チャンバー（反応ゾーン）

26：液体リザーバー

27：リザーバー体

28：第一の試薬部位

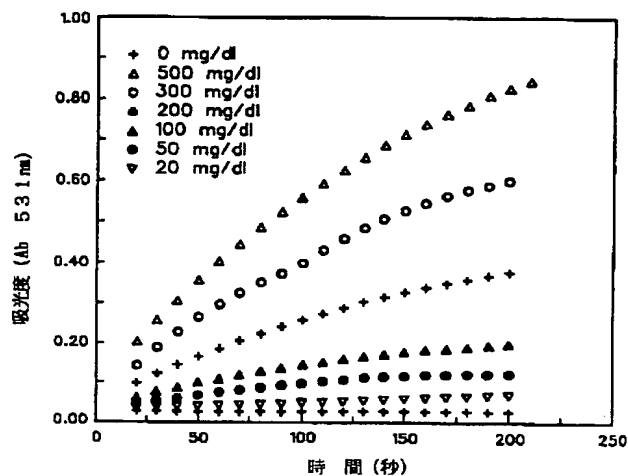
32a：第二の試薬部位

32b：第三の試薬部位

42：視認口

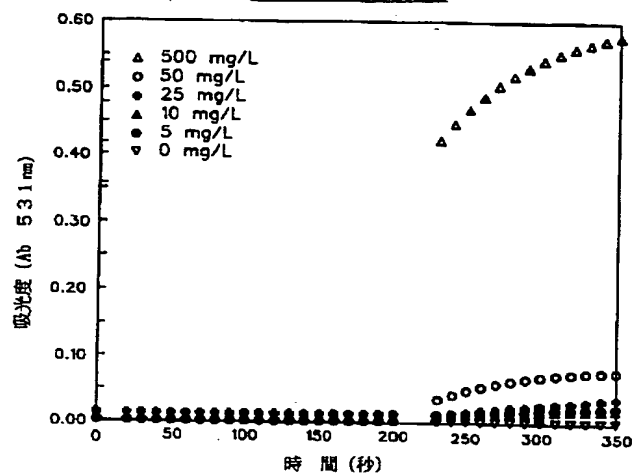
【図 1】

クレアチニンアッセイ
クレアチニンとの反応応答



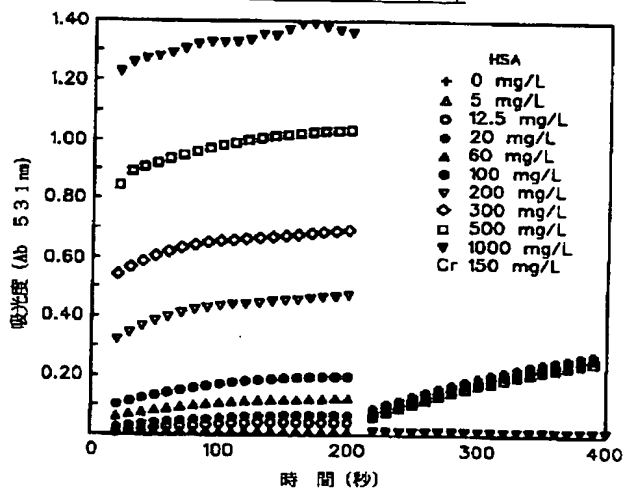
【図 2】

HSAアッセイ
HSAとの反応応答



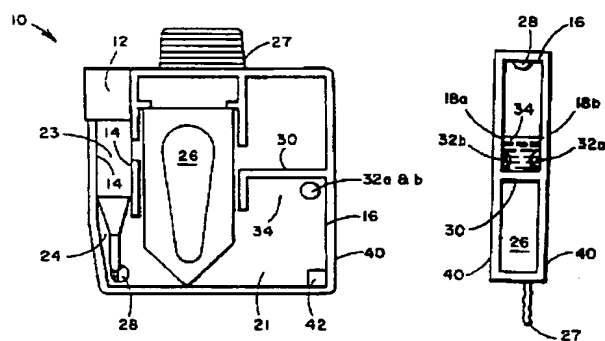
【図 3】

HSA/クレアチニンアッセイ

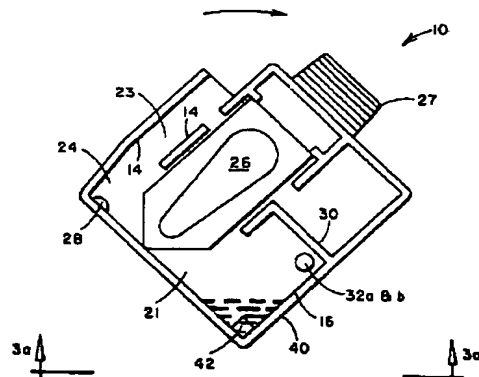


【図 4】

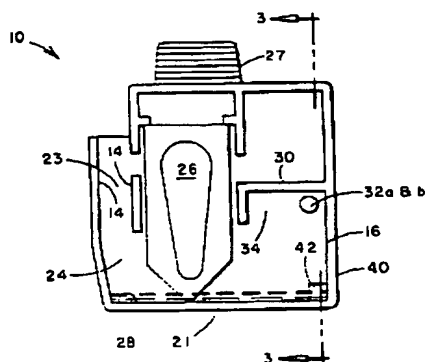
【図 8】



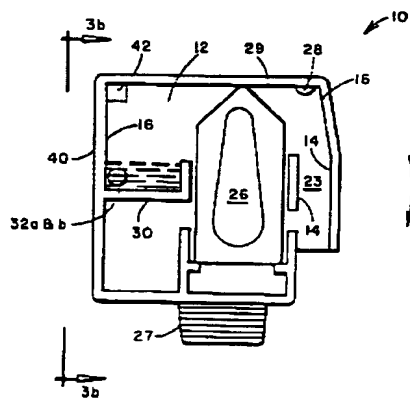
【図 6】



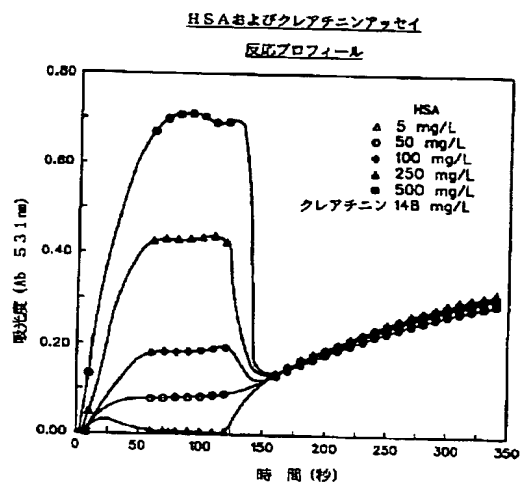
【図 5】



【図7】



【図9】



フロントページの続き

(72) 発明者 エミー・エイチ・チュー
アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、
エルクハート、カウンティ・ロード・ナン
バー10 22640

(72) 発明者 ブレンダ・チューダー
アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、
エルクハート、アンナ・ドライブ 2041